

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Effekt von Sugammadex, Rocuronium und des Rocuronium-Sugammadex-  
Komplexes auf plasmatische Gerinnungsassays, thromboelastometrische  
Vollblut-Gerinnungsanalysen und Aktivitäten plasmatischer Gerinnungsfaktoren  
in vitro

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Henning Pauling  
aus Essen  
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Peters

2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. medic. V. Rebmann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2014

Für meine Eltern und meine Frau

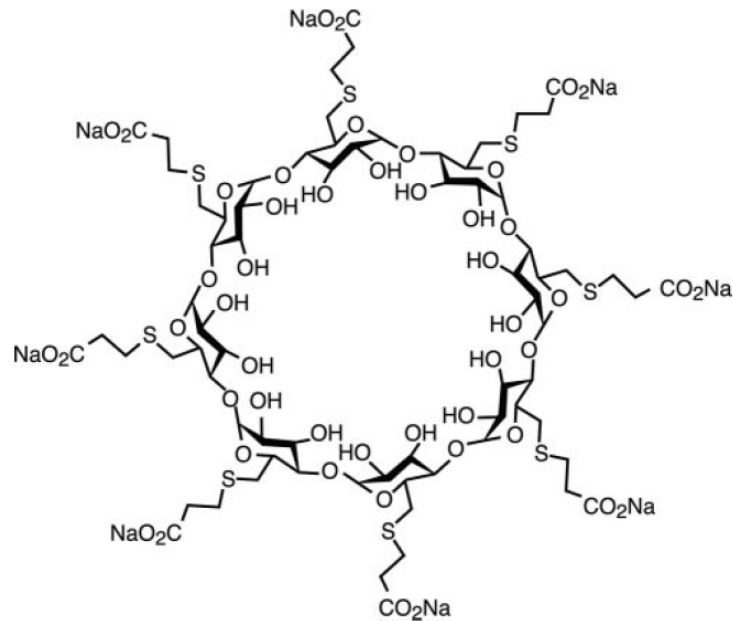
## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung.....	5
2. Material und Methoden .....	11
2.1 Probanden und Blutentnahmen .....	11
2.2 Messverfahren .....	12
2.3 Untersuchungsprotokoll .....	21
2.4 Statistik .....	24
3. Ergebnisse .....	26
3.1 Effekte auf die Werte plasmatischer Gerinnungsanalysen.....	26
3.2 Effekte auf die Variablen rotationsthromboelastometrischer Assays in humanem Vollblut .....	28
3.3 Effekte auf die Aktivität plasmatischer Gerinnungsfaktoren .....	31
4. Diskussion.....	34
5. Zusammenfassung .....	43
6. Literaturverzeichnis .....	44
7. Abkürzungen.....	50
8. Danksagung.....	52
9. Lebenslauf .....	53

## 1. Einleitung und Fragestellung

Sugammadex (Bridion<sup>®</sup>) ist ein in Europa und weiteren Ländern seit dem Jahr 2008 zugelassener Antagonist nicht depolarisierender, steroidalster Muskelrelaxanzien (Rocuronium und Vecuronium) (Sparr, H.J. et al., 2009). Darüber hinaus existieren vereinzelte Fallbeschreibungen, die über eine vorgeblich erfolgreiche Therapie mit Sugammadex bei Rocuronium-induzierten anaphylaktischen Schocks berichten (McDonnell, N. et al., 2011).

Entsprechend seiner Molekülstruktur handelt es sich beim Sugammadex-Molekül um ein modifiziertes  $\gamma$ -Cyclodextrin. Dementsprechend besteht es aus 8 ringförmig angeordneten Glucosemolekülen, die  $\alpha$ -1-4-glykosidisch miteinander verknüpft sind ( $\gamma$ -Cyclodextrin) (Bom, A. et al., 2002). Durch diese Konfiguration bildet das Molekül eine 0,75 nm messende hydrophobe Kavität und eine 0,85 nm messende hydrophile Außenseite aus (Bom, A. et al., 2002). Um eine bessere Bindung der steroidalster Muskelrelaxanzien zu ermöglichen, wurden die Glucosemoleküle jeweils durch eine negativ geladene Seitenkette mit Carboxylenden modifiziert, wodurch die Kavität auf 1,1 nm erweitert wird (Abb. 1) (Bom, A. et al., 2002). Im Allgemeinen ermöglicht es die ringförmige Konfiguration den Cyclodextrinen, lipophile Moleküle durch van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen in der Kavität zu binden. Diese Eigenschaft macht sie zu guten Lösungsvermittlern für lipophile Substanzen (Szejtli, J., 2004). Klinische Anwendung finden Cyclodextrine beispielsweise, um etwa die Bioverfügbarkeit schlecht wasserlöslicher, lipophiler Wirkstoffe, wie z. B. von Ibuprofen oder Vitamin D3 zu steigern (Davis, M. E. und Brewster, M. E., 2004).



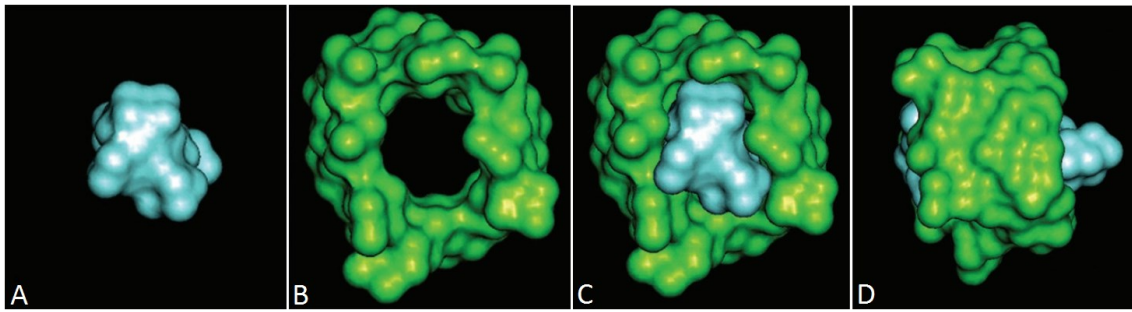
**Abb. 1:** Molekularstruktur von Sugammadex. Die Durchmesser der inneren Kavität und des äußeren Rings betragen ca. 0,75 bzw. 0,85 nm. Die Modifikation der Molekularstruktur durch negativ geladene Seitenketten erweitert die Kavität des Moleküls auf etwa 1,1 nm. Hierdurch erhöht sich die Affinität zu steroidal Muskelrelaxanzien (nach Naguib, 2006).

Der Wirkmechanismus von Sugammadex als Antagonist steroidal Muskelrelaxanzien basiert auf dessen Komplexbildung mit den im Plasma befindlichen Muskelrelaxans-Molekülen in einem 1:1 Verhältnis. Die steroidal Muskelrelaxanzien werden dabei in der Kavität des Sugammadex-Moleküls „eingekapselt (enkapsuliert)“. In Abbildung 2 sind die Molekularstrukturen von Sugammadex, Rocuronium und des entstehenden Rocuronium-Sugammadex-Komplexes kristallographisch dargestellt.

Durch die im Intravasalraum stattfindende Komplexbildung entsteht ein Konzentrationsgradient, der von der neuromuskulären Endplatte in den Intravasalraum gerichtet ist. Die daraus resultierende rasche Abdiffusion der Muskelrelaxanzien von der neuromuskulären Endplatte führt zu einer Aufhebung oder Verminderung der neuromuskulären Blockade (Naguib, M.,

2007). Eine eigenständige Wirkung im Bereich der neuromuskulären Endplatte, wie bei Hemmstoffen der Acetylcholinesterase (z. B. Neostigmin), findet somit nicht statt (Naguib, M., 2007). Die äußerst starke Bindung des Muskelrelaxans an das Sugammadex-Molekül (Assoziationskonstante  $K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) soll eine Dissoziation der Moleküle verhindern (Bom, A. et al., 2002) und somit auch mögliche Rebound-Phänomene (Gijsenbergh, F. et al., 2005, Ledowski, T. et al., 2013), wie sie auch nach Anwendung hoher Dosierungen von Acetylcholinesterasehemmstoffen auftreten können (Kim, K. S. et al., 2002).

Die zur Antagonisierung einer neuromuskulären Blockade notwendige Dosierung von Sugammadex wird mit zwischen 2 mg/kg Körpergewicht (zur routinemäßigen Antagonisierung einer am Operationsende bestehenden Restrelaxation) bis maximal 16 mg/kg Körpergewicht (zur notfallmäßigen Antagonisierung einer zur Rapid-Sequence-Induction verabreichten Intubationsdosis von Rocuronium) angegeben (Sorgenfrei, I. F. et al., 2006, Shields M. et al., 2006). In einer Pilotstudie an 29 gesunden Männern wurde bei einer Sugammadex Dosierung von 8 mg/kg Körpergewicht die Reversierung (definiert als TOF-Ratio > 0,9) einer 3 Minuten zuvor durch Injektion von 0,6 mg/kg Körpergewicht Rocuronium induzierten, neuromuskulären Blockade innerhalb von 1,0 bis 1,2 Minuten nach Injektion beobachtet (Gijsenbergh, F. et al., 2005).



**Abb. 2:** Röntgenstrukturanalyse des Rocuronium-Moleküls (A) und des Sugammadex-Moleküls (B) sowie Struktur beider Moleküle im Rocuronium-Sugammadex-Komplex in der Vorder- (C) und Seitenansicht (D). (Modifiziert nach Naguib et al., 2007)

Sugammadex gilt als hochselektiv, sicher und gut verträglich (Gijzenbergh, F. et al., 2005; Sorgenfrei, I. F. et al. 2006; Mirakhur, R. K., 2009; Abrishami, A. et al., 2009). Während die Substanz bereits seit dem Jahr 2008 in Europa und weiteren Ländern zugelassen ist (European public assessment report for Bridion, EPAR, 2012), steht eine Zulassung durch die United States Food and Drug Administration (FDA) bislang aus. Diese forderte bereits im Jahr 2008 vom Sugammadex-Hersteller weitere Daten bezüglich des allergenen Potentials und einer möglichen Beeinflussung von Blutgerinnungsvariablen und zur Inzidenz perioperativer Blutungskomplikationen (Naguib, M. und Brull, S. J., 2009).

Die europäische Zulassungsbehörde (European Medicines Agency, EMA) gibt in den veröffentlichten Informationen zu Sugammadex nämlich an, dass in Studien im Rahmen der Arzneimittelzulassung eine passagere Verlängerung der Gerinnungszeiten in plasmatischen Gerinnungsanalysen beobachtet wurde und rät zur Vorsicht beim Einsatz bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Gerinnungsstörungen bzw. solchen unter Antikoagulation (European public assessment report for Bridion, EPAR, 2012). Im Einzelnen führte eine in vivo Applikation von Sugammadex (4 bzw. 16 mg/kg



Körpergewicht) zu einer mittleren Verlängerung der Prothrombinzeit (PT) um 11% bzw. 22% und der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) um 17% bzw. 20% (European public assessment report for Bridion, EPAR, 2012). Eine aktuelle, bislang unpublizierte Studie untersuchte zuletzt die Inzidenz postoperativer Blutungskomplikationen sowie Veränderungen plasmatischer Gerinnungsanalysen (PT und aPTT) bei Patienten nach Hüftgelenksfrakturen oder Hüft-/Kniegelenkserersatz, die eine Thromboseprophylaxe mit niedermolekularen Heparinen erhielten (registriert im August 2011, NCT01422304).

Da bisherige Untersuchungen also offenbar lediglich auf einige wenige, plasmatische Gerinnungsanalysen (PT und aPTT) beschränkt waren, war es Ziel der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, ob sich die bereits unter in vivo Anwendungen beschriebenen Einflüsse von Sugammadex auch auf plasmatische Gerinnungstests in vitro nachvollziehen lassen. Darüber hinaus sollten weitere Untersuchungen in Plasma und Vollblut mögliche Effekte von Sugammadex auf das Gerinnungssystem näher charakterisieren.

Nachdem bereits in einem weiteren Untersuchungsansatz durch die Arbeitsgruppe Effekte von Sugammadex auf die Thrombozytenaggregation getestet wurden (vgl. auch Dissertation Weidle), wurden mit der vorliegenden Arbeit die Effekte von Sugammadex, Rocuronium und des Rocuronium-Sugammadex-Komplexes auf plasmatische Gerinnungsassays (PT, aPTT, Thrombinzeit (TZ) und Fibrinogenkonzentration) untersucht. Des Weiteren wurden etwaige Effekte auf Variablen viskoelastischer Vollblut-Gerinnungsassays (Rotationsthromboelastometrie; ROTEM®) mit extrinsischer

und intrinsischer Aktivierung untersucht. Die dabei sowohl in den plasmatischen als auch in den Vollblut-Untersuchungen beobachteten Veränderungen der Gerinnungsvariablen veranlassten uns schließlich, auch Effekte auf die Aktivität einzelner, plasmatischen Gerinnungsfaktoren zu untersuchen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Probanden und Blutentnahmen**

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen erfolgten nach Billigung durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Aufklärung sowie schriftlicher Einwilligung von insgesamt 18 gesunden, freiwilligen Probanden (8 Frauen, 10 Männer) im Alter von 23 bis 51 Jahren ( $33,1 \pm 7,1$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Alle Probanden gaben an, innerhalb eines Zeitraums von zumindest 10 Tagen vor der Blutentnahme keine gerinnungswirksamen Substanzen eingenommen zu haben und wiesen eine negative Blutungs- und Thrombophilie-Anamnese auf.

Die Blutentnahmen erfolgten unter kurzfristiger Venostase in Natriumcitrat enthaltende Teströhrchen (Mischungsverhältnis 1:10) der Firma Sarstedt (Monovette<sup>®</sup>, Nümbrecht) mit einer Kapazität von 3 ml. Diese Röhrchen enthalten 0,3 ml einer 3,8-prozentigen Natriumcitratlösung, die das für die Hämostase notwendige Calcium bindet und das Blut damit ungerinnbar macht. Insgesamt wurden den Probanden jeweils 30-60 ml Vollblut abgenommen. Das jeweils erste Teströhrchen wurde wegen potentieller Probenkontamination mit Gewebethromboplastin verworfen. Die restlichen Teströhrchen wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 2 Stunden nach der Blutentnahme verwertet. Eine Lagerung über diesen Zeitraum beeinflusst Ergebnisse in der Rotationsthromboelastometrie nicht (Bowbrick, V. A. et al., 2000).

## 2.2 Messverfahren

Die plasmatischen Gerinnungsassays und die Aktivitätsbestimmung der plasmatischen Gerinnungsfaktoren erfolgten durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen entsprechend dortiger Standards und unter Verwendung von Assays und Reagenzien der Firma Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (Eschborn, Deutschland). Die plasmatischen Gerinnungsanalysen wurden mit dem BCS<sup>®</sup> XP System und die Einzelfaktoranalysen mit dem BCS<sup>®</sup> System (beide Firma Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) durchgeführt.

Für die Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ) wurde der kommerziell erhältliche Test Dade<sup>®</sup> Innovin<sup>®</sup> (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) verwendet. Dieser basiert auf Aktivierung der Blutgerinnung in Citratplasma mittels Rekalkifizierung und Zusatz eines Reagenzes, das eine Mischung aus rekombinantem humanen Gewebefaktor (tissue factor) sowie synthetisch hergestellten Phospholipiden und Stabilisatoren enthält. Im Anschluss wird die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels photometrisch gemessen. Der Test ist entsprechend der DIN-Norm 58910 (DIN-Taschenbuch 261, 2010) standardisiert.

Zur Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) wurde der Test Dade Actin<sup>®</sup> FSL (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) verwendet. Hier findet eine gereinigte Sojabohnen- und Kaninchenhirn-Phospholipid-Lösung mit Ellagsäure Verwendung. Die Gerinnung wird durch Vermischung von rekalkifiziertem Citratplasma mit Phospholipiden und dem Oberflächenaktivator Ellagsäure ausgelöst und dann wiederum die Zeit bis zur Gerinnselbildung photometrisch gemessen. Die

Bedingungen, unter denen dieser Test durchgeführt werden muss, sind in der DIN-Norm 58908 (DIN-Taschenbuch 261 2010) festgelegt.

Zur Messung der Thrombinzeit (TZ) im Citratplasma fand das BC Thrombin-Reagenz<sup>®</sup> (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) Verwendung. Das Messprinzip beruht auf Aktivierung der Blutgerinnung mit lyophilisiertem bovinen Thrombin und Albumin. Auch hier wird die Zeit zur Gerinnungsbildung photometrisch gemessen. Die Messbedingungen sind in der DIN-Norm 58914 (DIN-Taschenbuch 261, 2010) festgelegt.

Die Analyse der Fibrinogenkonzentration in Citratplasma wurde mit dem Test Multifibren U<sup>®</sup> (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Dieser basiert auf der Bestimmung des Fibrinogens nach Clauss, wobei ein großer Überschuss an Thrombin verwendet wird. Unter diesen Bedingungen ist die Gerinnungszeit überwiegend von der Fibrinogenkonzentration in der Probe abhängig (Clauss, A., 1957).

Zur Bestimmung der Faktoraktivitäten der Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin), VII (Prokonvertin) und X (Stuart-Prower-Faktor) des extrinsischen Systems wurden Einstufentests mit Mangelplasmen der Firma Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (Eschborn, Deutschland) verwendet. Das Messprinzip beruht auf Dilution der zu messenden Probe mit einem entsprechenden Mangelplasma und der Messung der Thromboplastinzeit. Eine Probe, die einen Mangel an einem der zu analysierenden Faktoren aufweist, wird überproportional diluiert. Daraus resultiert eine verlängerte Zeit bis zur Gerinnungsbildung. Die Beeinflussung der Gerinnungszeit wird dann prozentual im Vergleich zu einem Normplasma-Pool angegeben.

Die Aktivitätsbestimmung des Faktors V (Proaccelerin) basiert auf demselben Messprinzip wie die beschriebene Bestimmung der TPZ mit dem Test Dade<sup>®</sup> Innovin<sup>®</sup>, mit der Ausnahme, dass die zu analysierende Probe mit kommerziell erhältlichem Faktor-V-Mangelplasma (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) verdünnt wird. Die Faktor-V-Aktivität wird dann anhand einer Bezugskurve in „Prozent der Norm“ angegeben.

Die Aktivitäten der Faktoren VIII (Antihämophiles Globulin A), IX (Christmas-Faktor), XI (Rosenthal-Faktor) und XII (Hageman-Faktor) des intrinsischen Systems wurden ebenfalls mittels Mangelplasmen (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) bestimmt. Die Messung beruht auf denselben Prinzipien, allerdings wird hier die aktivierte partielle Thromboplastinzeit gemessen und ins Verhältnis zu einem Normalplasma-Pool gesetzt. Die Testbedingungen für den Faktor VIII sind in der DIN 58909 Teil 1 spezifiziert (DIN-Taschenbuch 261, 2010). Dabei ist speziell diese Bestimmung problembehaftet und störanfällig (Lusher, J. M. et al., 1996).

Auf einem anderen Messprinzip beruht die Bestimmung von Faktor XIII (Fibrin-stabilisierender Faktor). Der in der Probe enthaltene Faktor XIII wird durch Zusatz von Thrombin aktiviert. Das ebenfalls durch Thrombin gebildete Fibrin wird durch ein aggregationshemmendes Peptid in Lösung gehalten. Der aktivierte Faktor XIII verbindet ein Peptidsubstrat mit Glycinethylester unter Bildung von Ammoniak. Das gebildete Ammoniak reagiert in einer enzymatisch durch Glutamatdehydrogenase katalysierten Reaktion unter Verbrauch der oxidierten Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Alpha-Ketoglutarat zur reduzierten Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und Glutamat. Die Abnahme an NADH wird photometrisch über die

Extinktion bei 340 nm gemessen. Für die Bestimmung wurde der Test Berichrom F XIII<sup>®</sup> verwendet (Fickenscher, K. et al., 1991, Karimi, M. et al., 2009).

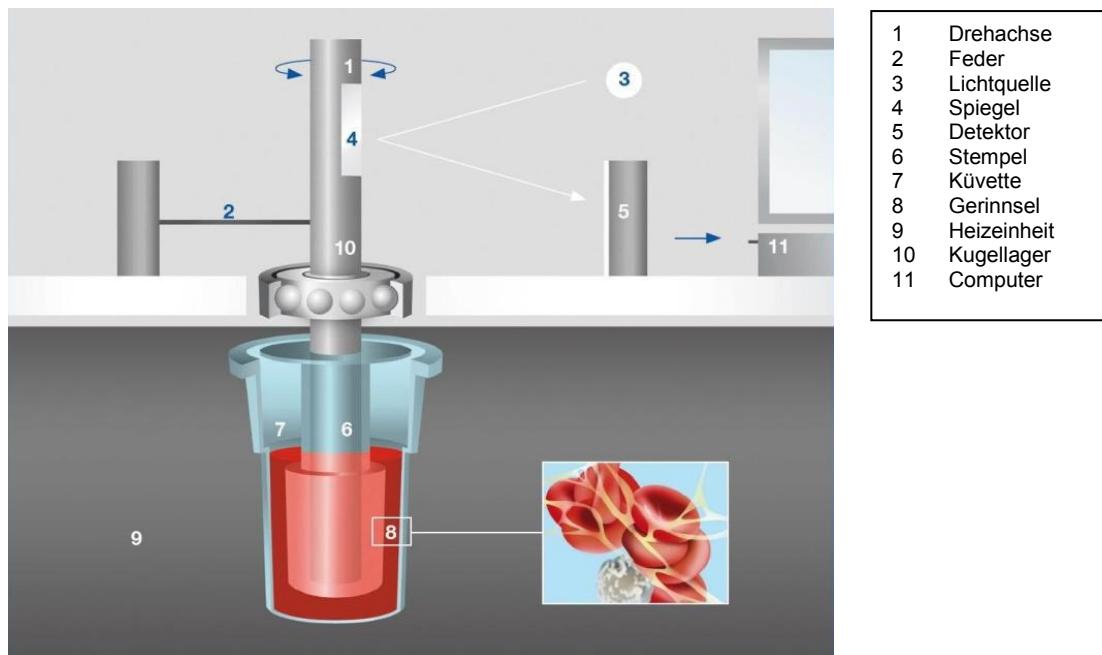
Die Thrombelastographie (TEG<sup>®</sup>) ist ein bereits 1948 von Hartert entwickeltes Verfahren zur Analyse der viskoelastischen Eigenschaften humanen Vollbluts oder Plasmas. Im Vergleich zu konventionellen, einstufigen, plasmatischen Gerinnungstests erlaubt die TEG<sup>®</sup> nicht nur die Erfassung einer (aktivierten) Gerinnungszeit, sondern erlaubt erweiterte Einblicke in Aspekte der Gerinnungsbildung, Gerinnungspolymerisation, Gerinnungsfestigkeit sowie die Fibrinolyse. Neben Effekten, die beispielsweise durch Fibrinogenmangel, Thrombozytopenien oder Thrombozytopathien hervorgerufen werden, können auch eine (Hyper-)Fibrinolyse und die Effekte von Heparin und Protamin, z. B. im Rahmen von Herzoperationen (Mittermayr et al., 2009) erfasst werden (Hartert, H., 1948, Larsen, O. H. et al, 2011).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ROTEM<sup>®</sup>-Analysen wurden auf 3 ROTEM<sup>®</sup> Coagulation Analyzern, Typ Delta, der Firma Tem International GmbH, München durchgeführt. Bei der Rotationsthromboelastometrie handelt es sich um eine Weiterentwicklung der TEG<sup>®</sup>, bei der insbesondere das Messverfahren modifiziert und weniger stör anfällig gemacht wurde. Jeder der ROTEM<sup>®</sup>-Analyser verfügt über vier parallel zu betreibende Messkanäle. Die Einmalmessküvetten befinden sich während der Messung jeweils in einem Heizblock, der auf eine vorgewählte Temperatur erhitzt wird (in der Regel 37°C). Sämtliche Messungen in dieser Arbeit fanden ebenfalls bei 37 °C statt. Abweichend von der klassischen TEG<sup>®</sup> nach Hartert wird bei der

Rotationsthrumboelastometrie während der Messung nicht das Probengefäß um den Stempel gedreht, sondern der über ein Kugellager drehbar gelagerte Stempel über eine Feder angetrieben und alternierend um  $4,75^\circ$  bewegt. Eine beginnende Gerinnselfbildung in der Messküvette vermindert sodann die Drehbewegung. Diese wird mit einem mechano-optischen Messsystem aufgezeichnet, mit einem Software-Programm analysiert und graphisch als sogenanntes Temogramm dargestellt (Pentapharm GmbH, 2009).

Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau eines Messkanals eines ROTEM<sup>®</sup>-Analyzers. Das durch die Gerinnselfbildung entstehende Signal wird als Amplitude (Ordinate) gegen die Zeit (Abszisse) dargestellt. Die Verminderung der Gerinnselffestigkeit als Korrelat einer (Hyper-)Fibrinolyse oder einer Instabilität des Gerinnselfs zeigt sich durch eine im Verlauf der Analyse abnehmenden Amplitude. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für ein aufgezeichnetes Temogramm mit den erfassten viskoelastischen Variablen. Das Gerät verfügt über vier Messkanäle, die die simultane Messung von vier unterschiedlichen Gerinnungsassays ermöglichen. Für den ROTEM<sup>®</sup> Coagulation Analyzer stehen standardisierte Assays mit Gerinnungsaktivatoren zur Verfügung. Diese wurden auch für die durchgeführten Messungen in dieser Arbeit benutzt. Die Pipettierung der Reagenzien und der Blut- bzw. Plasmaproben erfolgt mittels einer über die Software des ROTEM<sup>®</sup>-Analyzers gesteuerten Automatikpipette. Bislang wurde die ROTEM<sup>®</sup>-Analyse zur Beurteilung der Wirkung klinisch verwendeter Dosen von Sugammadex auf die Gerinnungsaktivierung, die Gerinnselfbildung, die Gerinnselfpolymerisation und die Gerinnselffestigkeit nicht eingesetzt.





**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Messprinzips der Rotationsthromboelastometrie. Ein in die Blutprobe tauchender Stempel, der um  $4,75^\circ$  alternierend bewegt wird, reflektiert über einen Spiegel einen von einer Lichtquelle ausgesendeten Lichtstrahl. Die Detektionseinheit empfängt dieses Signal und wandelt es in elektrische Signale um. Die Darstellung erfolgt in Echtzeit am Monitor eines angeschlossenen Computers (siehe auch Abb. 4). (aus ROTEM® delta Bedienerhandbuch, Tem International GmbH, mit freundlicher Genehmigung)

Folgende Variablen werden bei der Rotationsthromboelastometrie erfasst:

Clotting Time (CT): Die Messung der CT startet, sobald die Plasma- oder Blutprobe in die Küvette pipettiert wird, welche bereits die Aktivatoren eines jeweiligen Assays enthält. Die Bestimmung der CT endet, sobald eine Amplitude von zwei Millimetern erreicht ist. Die CT ist dabei Ausdruck einer einsetzenden Gerinnselformung.

Clot Formation Time (CFT): Die CFT ist die Zeit nach der CT bis zum Erreichen einer definierten Amplitude von 20 mm.

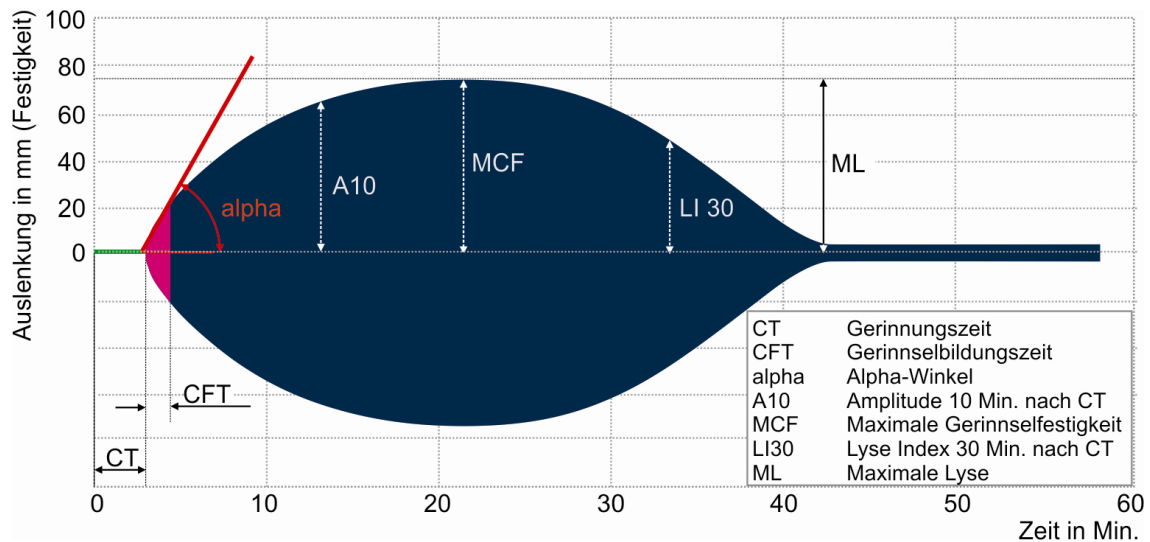
Alpha-Winkel: Der Alpha-Winkel entspricht dem Winkel zwischen der Zeitachse und der Tangente an dem aufgezeichneten Graphen, die durch den Beginn der CT verläuft.

A10: Die A10 bezeichnet die Amplitudenhöhe nach zehnminütiger Messzeit nach Beginn der CT.

Maximum Clot Firmness (MCF): Die MCF gibt die maximale Amplitude an, die im Verlauf der gesamten Messung erreicht wird.

Clot Lyse Index (CLI30, CLI45, CLI60): Der CLI ist definiert als die prozentuale Abnahme der maximalen Amplitude 30, 45 und 60 Minuten nach Einsetzen der Gerinnselbildung (CT), bezogen auf die MCF. Die Lyse Indices geben Auskunft über die Gerinnselstabilität.

Maximale Lyse (ML): Die „maximale Lyse“ zeigt die prozentuale Abnahme der Amplitude bezogen auf die MCF an.



**Abb. 4:** Beispiel eines Temogramms (aus [www.rotem.de](http://www.rotem.de), ©Tem International GmbH). Dargestellt sind die einsetzende Gerinnselformierung nach Rekalzifizierung (und ggf. Aktivierung) sowie die Lyse des entstandenen Gerinnselfs.

In dieser Arbeit kamen die folgenden Assays zur Anwendung:

#### EXTEM®:

Diesem Assay wird – zusammen mit dem zur Rekalzifizierung der Blutprobe notwendigen Kalziumchlorid (20 µl star-TEM®-Reagenz) – Gewebethromboplastin (20 µl EXTEM®-Reagenz, aus Kaninchenhirn gewonnener Tissue Factor und Phospholipide) zugegeben. Die Aktivierung der Blutgerinnung ist dabei vergleichbar zur Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ) bzw. des Quick-Werts. Im EXTEM® nehmen in erster Linie Faktoren des extrinsischen Gerinnungssystems Einfluss auf die so ermittelten Gerinnungszeiten. Dies sind die Faktoren I (Fibrinogen), II (Prothrombin), V (Proaccelerin), VII (Prokonvertin) und X (Stuart-Prower-Faktor). Das aktuell vertriebene flüssige EXTEM®-Reagenz enthält zudem einen spezifischen Heparin-Inhibitor, der die Analyse laut Herstellerangaben bis zu einer Konzentration von 4 U/ml unfraktioniertem Heparin unempfindlich gegen Heparineffekte macht.

### INTEM®:

Diesem Assay werden – zusammen mit Kalziumchlorid (20 µl star-TEM®) – Phospholipide sowie Ellagsäure als Aktivator des intrinsischen Gerinnungssystems zugegeben. Dieses geschieht analog zur Bestimmung der aPTT. Das INTEM® ermöglicht eine Analyse des so genannten intrinsischen Gerinnungssystems. In erster Linie sind dies die Faktoren I (Fibrinogen), II (Prothrombin), V (Proaccelerin), VIII (antihämophiles Globulin A), IX (Christmas-Faktor), X (Stuart-Prower-Faktor), XI (Rosenthal-Faktor) und XII (Hageman-Faktor). Das INTEM® ist nicht wie das EXTEM®-Assay durch einen Heparin-Inhibitor gegen Heparin-Einflüsse unempfindlich. Der Zusatz von Heparinase im sogenannten HEPTM®-Assay ermöglicht im Vergleich zu den Ergebnissen des INTEM®-Assays die Beurteilung möglicher Heparin-Effekte.

### FIBTEM®:

Beim FIBTEM®-Assay handelt es sich um ein modifiziertes EXTEM®-Assay, das zusätzlich Cytochalasin D, einen potenten Inhibitor der Thrombozytenfunktion und -aggregation, enthält. Die erzielte Festigkeit des Gerinnsels (MCF) wird damit überwiegend von der aktuellen Fibrinkonzentration abhängig. Dieser Assay erlaubt entsprechende Rückschlüsse auf die Fibrinogenkonzentration und die Fibrinpolymerisation einer Probe (Lang, T. und von Depka, M., 2006, Theusinger, O.M. et al., 2011), und zwar unabhängig von Thrombozytenkonzentration und -funktion.

### 2.3 Untersuchungsprotokoll

Die in dieser Untersuchung verwendete Konzentration von 130 µg/ml Sugammadex im Testansatz entspricht einer klinischen Dosierung von 16 mg Sugammadex / kg Körpergewicht. Dieser Berechnung liegen ein erwartetes Verteilungsvolumen von 11 bis 14 Litern sowie ein Hämatokrit von 0,45 zu Grunde, bei einem angenommenen Körpergewicht von 70 kg (Sparr, H. J. et al., 2007). Die Zugabe von Rocuronium erfolgte in äquimolarer Konzentration mit dem Ziel der vollständigen Komplexierung aller im Testansatz befindlichen Rocuronium- und Sugammadex-Moleküle zum Rocuronium-Sugammadex-Komplex. Da die molare Masse von Rocuronium ein Viertel der von Sugammadex beträgt, wurde eine finale Rocuroniumkonzentration von 32,5 µg/ml gewählt.

Die rotationsthromboelastometrischen, viskoelastischen Gerinnungsanalysen wurden in mittels Natriumcitrat antikoaguliertem, humanem Vollblut entsprechend der Herstellerangaben auf drei ROTEM® delta (TEM international, München, Deutschland), wie im Abschnitt 2.2 beschrieben, durchgeführt. Für jeden Probanden erfolgten drei Messdurchläufe unter Verwendung jeweils eines der im Abschnitt 2.2 beschriebenen Assays (EXTEM®, INTEM®, FIBTEM®). Die Blutproben wurden nach dem jeweiligen Abnahmezeitpunkt bei 37,0 °C für 30 Minuten inkubiert und während dieser Zeit die ROTEM®-Analyse vorbereitet. Hierzu wurden pro Assay jeweils vier Einmalküvetten nach folgendem Schema bestückt:

Kanal 1: „Kontrolle“:

40 µl Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Kanal 2: „Sugammadex“:

20 µl Sugammadex (finale Konzentration: 130 µg/ml) +

20 µl Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Kanal 3: „Sugammadex-Rocuronium-Komplex“:

20 µl Sugammadex (finale Konzentration: 130 µg/ml) +

20 µl Rocuronium (finale Konzentration: 32,5 µg/ml)

Kanal 4: „Rocuronium“:

20 µl Rocuronium (finale Konzentration: 32,5 µg/ml) +

20 µl Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Unmittelbar nach Abschluss des „Spikings“ der Messküvetten erfolgte die Durchführung der Assays entsprechend der Herstellerangaben. Die Analysen wurden für eine Dauer von zumindest 60 Minuten nach Bestimmung der CT fortgeführt, um so eine eventuell auftretende Fibrinolyse zu detektieren.

Für die plasmatischen Gerinnungsanalysen (Quick-Wert, aPTT, TZ und Bestimmung der Fibrinogenkonzentration nach Clauss) sowie die Einzelfaktoranalysen wurden jeweils 2 Monovetten (3000 µl Citratblut) anhand eines analogen Schemas präpariert:

Monovette 1: „Kontrolle“:

400 µl Natriumchloridlösung 0,9%

Monovette 2: „Sugammadex“:

200 µl Sugammadex (finale Konzentration: 130 µg/ml) +

200 µl Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Monovette 3: „Sugammadex-Rocuronium-Komplex“:

200 µl Sugammadex (finale Konzentration: 130 µg/ml) +

200 µl Rocuronium (finale Konzentration: 32,5 µg/ml)

Monovette 4: „Rocuronium“:

20 µl Rocuronium (finale Konzentration: 32,5 µg/ml) +

20 µl Natriumchlorid-Lösung 0,9%

Die Probenröhrchen wurden verschlossen und bei einer relativen Zentripetalbeschleunigung (RCF) von 1040 g für 10 Minuten zentrifugiert (Rotina 48R, Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurde der Plasmaüberstand sorgfältig dekantiert und sofort weiterverarbeitet. Die plasmatischen Gerinnungsanalysen und die Bestimmungen der Aktivitäten der plasmatischen Gerinnungsfaktoren erfolgten wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Wenn eine unmittelbare Fakturierung aus logistischen Gründen nicht möglich war, wurde der Plasmaüberstand bei -80 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet.

## 2.4 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Prism 6b für MAC OS X (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die erhobenen Werte der Variablen wurden zunächst mittels Kolmogorow-Smirnow-Test unter Verwendung einer Annäherung an die Lilliefors' Methode (nach Dallal und Wilkinson) auf Normalverteilung geprüft. Da diese nicht für alle Variablen gezeigt werden konnte, werden alle Daten, sofern nicht anders angegeben, im Folgenden als Median (25./75.Perzentile) dargestellt.

Im Einzelnen wurden folgende a priori Null-Hypothesen geprüft:

- Die Applikation von Sugammadex, Rocuronium und die gemeinsame Applikation von Rocuronium und Sugammadex führen in plasmatischen Gerinnungsassays (Quick, aPTT, TZ) sowie in der Bestimmung der Fibrinogenkonzentration nach Clauss nicht zu einer Beeinflussung der Werte der gemessenen Variablen.
- Die Applikation von Sugammadex, Rocuronium und die gemeinsame Applikation von Rocuronium und Sugammadex führen nicht zu Veränderungen der Gerinnungszeiten (CT und CFT) und der Gerinnselfestigkeit (MCF) in extrinsisch und intrinsisch aktivierten ROTEM®-Assays.
- Die Applikation von Sugammadex, Rocuronium und die gemeinsame Applikation von Rocuronium und Sugammadex führen nicht zu Veränderungen in den Aktivitäten plasmatischer Gerinnungsfaktoren.



Da eine Normalverteilung der Messvariablen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde bei Mehrfachvergleichen der Friedman-Test mit Dunn-Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers beim post hoc Test als nicht-parametrische Alternative zur Varianzanalyse verwendet. Für paarweise Vergleiche wurde entsprechend ein Wilcoxon signed-rank Test mit Bonferroni-Holm-Adjustierung des  $\alpha$ -Fehlers als Alternative zum t-Test für verbundene Stichproben verwendet.

Bei einem  $\alpha$ -Fehler  $p$  von unter 0,05 wurden eine Nullhypothese verworfen und statistisch signifikante Unterschiede angenommen.

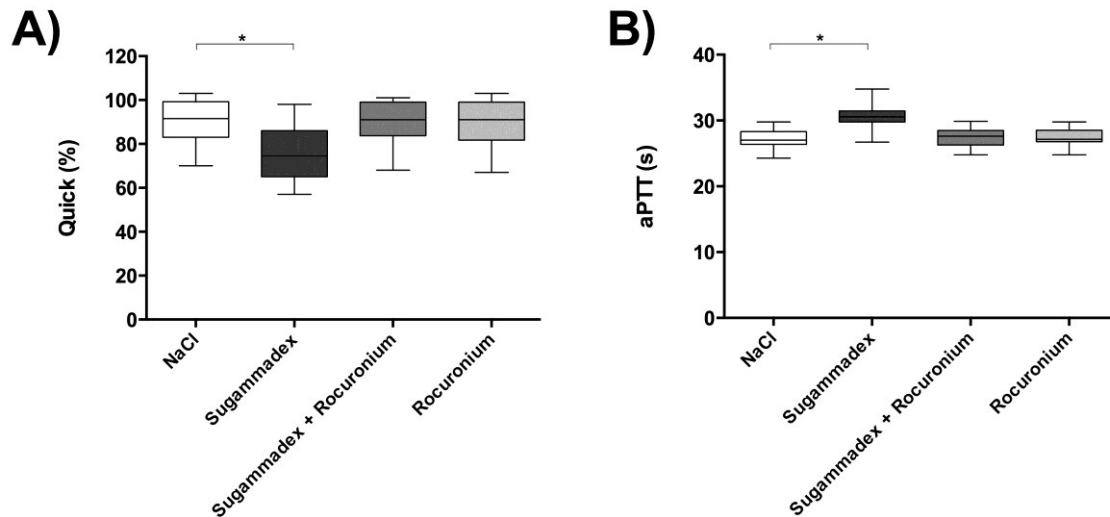
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Effekte auf die Werte plasmatischer Gerinnungsanalysen

Unter Zugabe von Sugammadex wurde der Quick-Wert signifikant reduziert, und zwar von 91,5% (83/99,25; Kontrolle) auf 74,5% (65/86;  $p < 0,0001$ ). Dies entspricht einer mittleren prozentualen Abnahme um 16,6%. Weder die kombinierte Applikation von Sugammadex und Rocuronium (91% (83,75/99)) noch die alleinige Applikation von Rocuronium (91% (81,75/99)) führten hingegen zu signifikanten Änderungen des Quick-Wertes (Abb. 5, Tab. 1).

Die aPTT wurde durch Sugammadex im Vergleich zur Kontrolle signifikant von 27 s (26,4/28,3) auf 30,6 s (29,8/31,5) verlängert ( $p = 0,0002$ ). Dies entspricht einer mittleren prozentualen Verlängerung um 13,1%. Weder die alleinige Applikation von Rocuronium (27,2 s (26,8/28,5)) noch die kombinierte Applikation von Rocuronium und Sugammadex (27,6 s (26,3/28,5)) führten hingegen zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5, Tab. 1).

Weder die Thrombinzeit noch die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration wurden durch Zugabe von Sugammadex, Rocuronium oder kombinierte Applikation von Sugammadex und Rocuronium signifikant beeinflusst. Die Ergebnisse für alle plasmatischen Gerinnungsanalysen sind in Tabelle 1 dargestellt.



**Abb. 5:** Effekte von Sugammadex, Rocuronium sowie Sugammadex und Rocuronium kombiniert auf A) Quick-Wert und B) aktivierte partielle Thromboplastinzeit. Werte von 18 Probanden, dargestellt als Boxplot mit Median, 25./75. Perzentilen und Spannweite.

\*statistisch signifikanter Unterschied

**Tabelle 1:** Ergebnisse plasmatischer Gerinnungsanalysen nach Applikation von Natriumchloridlösung (Negativkontrolle), Sugammadex, Rocuronium allein sowie von Sugammadex und Rocuronium in Kombination.

Assay (Probandenzahl)		Median (25./75. Perzentile)	Mittlere Abweichung von der Kontrolle (%)	p-Wert
Quick (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	91,5 (83 / 99,25)	100	
	Sugammadex	74,5 (65 / 86)	83,4	* <0,0001
	Sugammadex + Rocuronium	91 (83,75 / 99)	98,6	
	Rocuronium	91 (81,75 / 99)	98,9	
TZ (s) (n = 8)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	18,5 (18,1 / 19)	100	
	Sugammadex	18,7 (18,3 / 19,3)	101,1	
	Sugammadex + Rocuronium	18,7 (18,1 / 19,5)	101,4	
	Rocuronium	18,5 (18,2 / 18,8)	99,6	
aPTT (s) (n = 8)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	27 (26,4 / 28,3)	100	
	Sugammadex	30,6 (29,8 / 31,5)	113,1	* <0,0002
	Sugammadex + Rocuronium	27,6 (26,3 / 28,5)	101,3	
	Rocuronium	27,2 (26,8 / 28,5)	101,1	
Fibrinogen (mg/dl) (n = 8)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	218,5 (204,3 / 238)	100	
	Sugammadex	222 (212,3 / 246,5)	101,4	
	Sugammadex + Rocuronium	222,5 (210,8 / 244,3)	104,8	
	Rocuronium	224,5 (209,8 / 245,8)	101,9	

Quick-Wert [s]; TZ: Thrombinzeit [s]; aPTT: aktivierte partielle Thromboplastinzeit [s] und Fibrinogenkonzentration [mg/dl]; \*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle

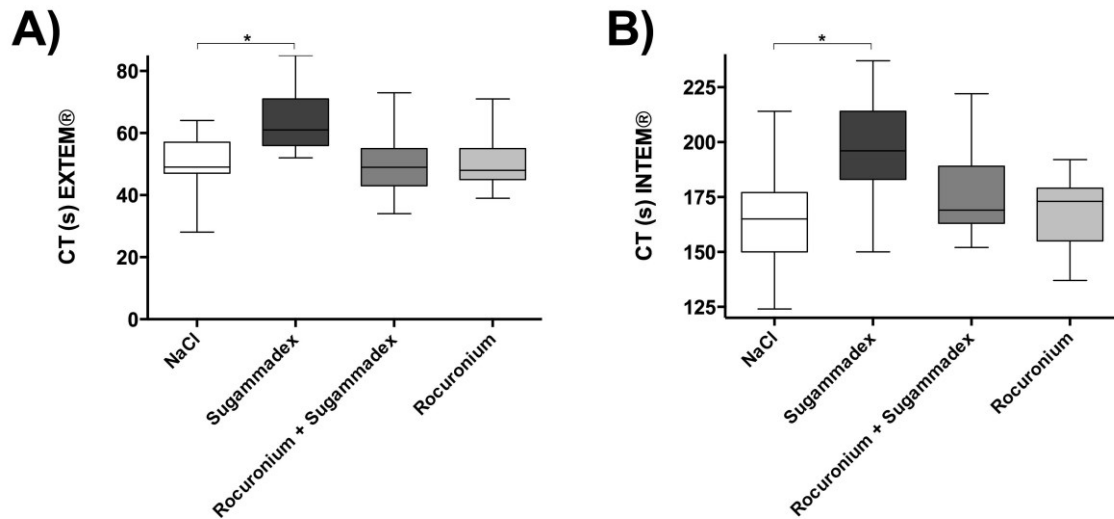
### 3.2 Effekte auf die Variablen rotationsthemboelastometrischer Assays in humanem Vollblut

Die Zugabe von Sugammadex führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Verlängerung der CT im EXTEM<sup>®</sup>-Assay von 49 s (47/57) auf 61 s ((56/71);  $p=0,0021$ ; mittlere Verlängerung um 33,1%). Im Testansatz mit Sugammadex und Rocuronium in äquimolarer Konzentration kombiniert, kam es im Vergleich zur Kontrolle hingegen zu keiner signifikanten Beeinflussung der CT (49 s (43/55)). Ebenso übte die alleinige Applikation von Rocuronium (48 s (45/55)) keinen signifikanten Effekt auf die CT aus (Abb. 6, Tab. 2).

Die CT im INTEM<sup>®</sup> wurde durch Zusatz von Sugammadex signifikant (im Mittel um 22.4%) von 165 s (150/177; Kontrolle) auf 196 s (183/214) verlängert. Die kombinierte Applikation von Rocuronium und Sugammadex 169 s (163/189) sowie die Applikation von Rocuronium (173 s (155/179)) hatten hingegen keinen signifikanten Effekt (Abb. 6, Tab. 2).

Im Vergleich zur Kontrolle (101 s (81/118)) wurde die CFT im EXTEM<sup>®</sup>-Assay demgegenüber sowohl durch Sugammadex (83 s (65/93);  $p<0,0001$ ) als auch durch die kombinierte Applikation von Rocuronium und Sugammadex (91 s (79/104);  $p=0,016$ ) signifikant verkürzt. Die alleinige Zugabe von Rocuronium (91 s (79/104)) hatte keinen signifikanten Effekt (Tab. 2).

Weder die Applikation von Sugammadex oder Rocuronium noch die kombinierte Applikation beider Substanzen führten zu Veränderungen in den übrigen rotationsthemboelastometrischen Variablen. Alle Werte der Variablen sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 6:** Effekte von Sugammadex, Rocuronium sowie Sugammadex und Rocuronium kombiniert auf die rotationsthemboelastometrisch bestimmte Clotting Time (CT) im EXTEM®-Assay (A) und INTEM®-Assay (B). Werte von 18 Assays von 18 Probanden, dargestellt als Boxplot mit Median, 25./75. Perzentilen und Spannweite.

\*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

**Tabelle 2:** Ergebnisse rotationsthromboelastometrischer Analysen in humanem Vollblut nach Applikation von Natriumchloridlösung (Negativkontrolle), Sugammadex, Rocuronium allein sowie von Sugammadex und Rocuronium kombiniert.

Variable (Assay) (Probandenzahl)		Median (25./75. Perzentile)	Mittlere Abweichung von der Kontrolle (%)	p-Wert
CT (EXTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	49 (47 / 57)	100	
	Sugammadex	61 (56 / 71)	133,1	* 0,0021
	Sugammadex + Rocuronium	49 (43 / 55)	101,3	
	Rocuronium	48 (45 / 55)	104,3	
CFT (EXTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	101 (81 / 118)	100	
	Sugammadex	83 (65 / 93)	84	* <0,0001
	Sugammadex + Rocuronium	91 (79 / 104)	92	* 0,0016
	Rocuronium	94 (77 / 108)	95,8	
MCF (EXTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	60 (56 / 64)	100	
	Sugammadex	59 (58 / 67)	101	
	Sugammadex + Rocuronium	60 (58 / 64)	101	
	Rocuronium	60 (56 / 63)	100	
CLI60 (EXTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	89 (87 / 92)	100	
	Sugammadex	88 (86 / 91)	99,4	
	Sugammadex + Rocuronium	89 (87 / 92)	100,3	
	Rocuronium	89 (87 / 92)	100,5	
CT (INTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	165 (150 / 177)	100	
	Sugammadex	196 (183 / 214)	122,4	* <0,0001
	Sugammadex + Rocuronium	169 (163 / 189)	107,5	
	Rocuronium	173 (155 / 179)	104,4	
CFT (INTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	71 (62 / 81)	100	
	Sugammadex	75 (61 / 82)	102,9	
	Sugammadex + Rocuronium	71 (64 / 79)	100,9	
	Rocuronium	73 (64 / 77)	100,1	
MCF (INTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	58 (56 / 63)	100	
	Sugammadex	58 (56 / 62)	100,3	
	Sugammadex + Rocuronium	57 (56 / 63)	99,4	
	Rocuronium	57 (56 / 61)	99,2	
CLI60 (INTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	91 (87 / 92)	100	
	Sugammadex	90 (87 / 92)	99,9	
	Sugammadex + Rocuronium	91 (87 / 93)	100,3	
	Rocuronium	90 (87 / 92)	100,3	
MCF (FIBTEM®) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	12 (10 / 14)	100	
	Sugammadex	13 (10 / 15)	106,2	
	Sugammadex + Rocuronium	10,5 (8,25 / 13)	88,6	* 0,0054
	Rocuronium	11 (19 / 13)	98,4	

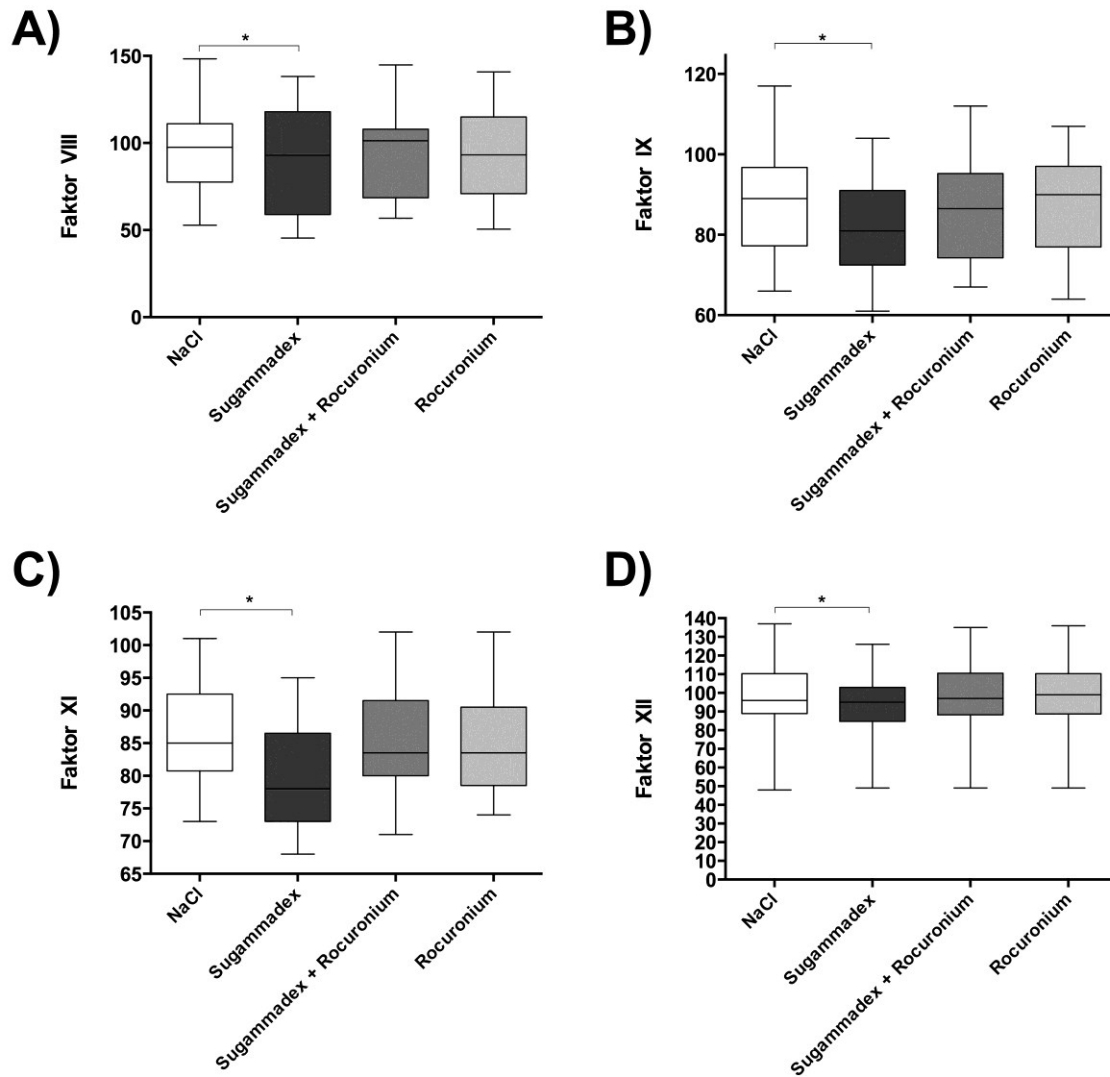
CT: Clotting Time [s]; CFT: Clot Formation Time [s]; MCF: Maximum Clot Firmness [mm]; CLI60: Clot Lyse Index nach 60 Minuten [%]; EXTEM®: extrinsische Aktivierung; INTEM®: intrinsische Aktivierung; FIBTEM®: EXTEM® mit Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Cytochalasin D; \*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle

### 3.3 Effekte auf die Aktivität plasmatischer Gerinnungsfaktoren

Die Zugabe von Sugammadex führte im Vergleich zur internen Kontrolle zu einer signifikanten Verminderung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI und XII. Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, X und XIII blieb hingegen unbeeinflusst.

Im Einzelnen wurde die Faktor VIII Aktivität durch Sugammadex im Mittel um 7% von 97,5% (77,53/111,1; Kontrolle) auf 92,9% (58,9/117,9;  $p=0,009$ ) signifikant vermindert. Die Faktor IX Aktivität wurde durch Zugabe von Sugammadex im Mittel um 7,8% von 89% (77,25/95,25; Kontrolle) auf 81% (72,5/91;  $p<0.0001$ ) reduziert. Die Faktor XI Aktivität wurde im Mittel um 6,9% von 85% (80,75/92,5; Kontrolle) auf 78% (73/86,5;  $p<0.0001$ ) signifikant vermindert. Die Faktor XII Aktivität wurde durch Zugabe von Sugammadex im Mittel um 4,3% von 96% (89/110,3; Kontrolle) auf 95% (84,75/103;  $p<0.0111$ ) reduziert (Abb. 7, Tab. 3).

Weder die Zugabe von Rocuronium noch die gemeinsame Applikation von Rocuronium und Sugammadex führten zu signifikanten Veränderungen in der Aktivität plasmatischer Gerinnungsfaktoren. Eine Übersicht der gemessenen Werte zeigt Tabelle 3.



**Abb. 7:** Effekte von Sugammadex, Rocuronium sowie Sugammadex und Rocuronium kombiniert auf die Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII (A), IX (B), XI (C) und XII (D). Werte von 18 Probanden, dargestellt als Boxplot mit Median, 25./75. Perzentilen und Spannweite.

\*statistisch signifikanter Unterschied



**Tabelle 3:** Aktivität von Gerinnungsfaktoren nach Applikation von Natriumchloridlösung (Negativkontrolle), Sugammadex, Rocuronium allein sowie Sugammadex und Rocuronium kombiniert.

Gerinnungsfaktor (Probandenzahl)		Median (25./75. Perzentile)	Mittlere Abweichung von der Kontrolle (%)	p-Wert
Faktor II (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	92 (86,25 / 97,75)	100	
	Sugammadex	92 (84,25 / 94,75)	97,6	
	Sugammadex + Rocuronium	92 (86,5 / 97,25)	100	
	Rocuronium	92 (87,75 / 96)	99,2	
Faktor V (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	97,5 (83,5 / 108,3)	100	
	Sugammadex	89,5 (82,25 / 102,8)	95,7	
	Sugammadex + Rocuronium	99,5 (89,25 / 105)	101,1	
	Rocuronium	96,5 (87,75 / 104,5)	101,8	
Faktor VII (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	85 (76 / 110,3)	100	
	Sugammadex	85 (75,75 / 100)	97	
	Sugammadex + Rocuronium	86 (76,5 / 107,8)	100,2	
	Rocuronium	90 (76 / 103)	101,9	
Faktor VIII (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	97,5 (77,53 / 111,1)	100	
	Sugammadex	92,9 (58,9 / 117,9)	93	* 0,009
	Sugammadex + Rocuronium	101,4 (68,53 / 107,9)	98	
	Rocuronium	93,2 (70,95 / 114,9)	97	
Faktor IX (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	89 (77,25 / 96,75)	100	
	Sugammadex	81 (72,5 / 91)	92,2	* <0,0001
	Sugammadex + Rocuronium	86,5 (74,25 / 95,25)	98,4	
	Rocuronium	90 (77 / 97)	98,3	
Faktor X (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	94,5 (83,25 / 99,5)	100	
	Sugammadex	93 (83 / 100,3)	99,6	
	Sugammadex + Rocuronium	96 (84,25 / 103,5)	101,9	
	Rocuronium	95 (84,5 / 102,3)	102,6	
Faktor XI (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	85 (80,75 / 92,5)	100	
	Sugammadex	78 (73 / 86,5)	93,1	* <0,0001
	Sugammadex + Rocuronium	83,5 (80 / 91,5)	99,1	
	Rocuronium	83,5 (78,5 / 90,5)	99,1	
Faktor XII (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	96 (89 / 110,3)	100	
	Sugammadex	95 (84,75 / 103)	95,7	* 0,0111
	Sugammadex + Rocuronium	97 (88,25 / 110,5)	99,5	
	Rocuronium	99 (88,75 / 110,3)	100,9	
Faktor XIII (%) (n = 18)	Kontrolle (NaCl 0,9%)	95,5 (76,75 / 114,3)	100	
	Sugammadex	97 (73,75 / 113)	98,9	
	Sugammadex + Rocuronium	96,5 (77,25 / 114,8)	100,2	
	Rocuronium	100 (78,5 / 104,8)	99,7	

\*signifikanter Unterschied zur Kontrolle

#### **4. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, etwaige Effekte von Sugammadex, Rocuronium und des Rocuronium-Sugammadex-Komplexes auf Werte von Variablen plasmatischer und viskoelastischer Gerinnungsassays sowie Aktivitäten plasmatischer Gerinnungsfaktoren in vitro zu untersuchen.

Dabei konnte eine signifikante Verlängerung der Gerinnungszeiten in den plasmatischen Gerinnungsassays (Quick-Wert, aPTT) sowie in den rotationsthromboelastometrischen Vollblut-Assays (CT INTEM<sup>®</sup> und EXTEM<sup>®</sup>) und darüber hinaus eine geringe, jedoch signifikante Reduktion der Aktivitäten der plasmatischen Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI und XII nachgewiesen werden, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Demgegenüber führten weder die Zugabe von Rocuronium allein noch die Zugabe äquimolarer Konzentrationen von Sugammadex und Rocuronium in Kombination zu signifikanten bzw. relevanten Veränderungen in den durchgeführten Assays. Dies belegt, dass die beobachteten Effekte durch Sugammadex hervorgerufen werden, und zwar vermutlich mittelbar durch dessen kavitäre Molekularstruktur. Alternativ wäre lediglich möglich, dass die Ausbildung eines Rocuronium-Sugammadex-Komplexes strukturelle Veränderungen der Außenhülle von Sugammadex selbst hervorruft, so dass eine Interaktion mit den einzig durch Sugammadex allein beeinflussten Prozessen verhindert wird.

Eine weitergehende Präzisierung der hier für Sugammadex erstmals in vitro nachgewiesenen antihämostatischen Mechanismen kann jedoch anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht vorgenommen werden.

Die in dieser Untersuchung durch in vitro Zugabe von Sugammadex (finale Konzentration: 130 µg/ml) hervorgerufene Reduktion des Quick-Wertes um 16,6% sowie die Verlängerung der aPTT um 13,1% sind in ihrer Ausprägung vergleichbar mit den bereits im Rahmen der Zulassungsstudien unter in vivo Anwendung des γ-Cyclodextrins Sugammadex beobachteten Effekten auf aPTT und den Quick-Wert (European Medicines Agency, 2008). Dies lässt folglich annehmen, dass der Effekt von Sugammadex auf einer direkten Interaktion mit den bei Quick-Wert- und aPTT-Analysen erfassten, plasmatischen Gerinnungsfaktoren beruht.

Darüber hinaus wurden die Gerinnungszeiten (Clotting Time; CT) extrinsisch und intrinsisch aktivierter rotationsthromboelastometrischer Assays um 33,1% bzw. 22,4% signifikant verlängert. Die prozentuale antihämostatische Wirkung war somit in den ROTEM<sup>®</sup>-Analysen also sogar wesentlich ausgeprägter, als in den korrespondierenden plasmatischen Assays, in denen Thrombozyten und zelluläre Blutbestandteile fehlen. Diese Beobachtung legt nahe, dass Sugammadex über die Beeinflussung plasmatischer Gerinnungsfaktoren hinaus auch Effekte auf beispielsweise die Thrombozytenfunktion ausübt.

Als mögliche Ziele von Sugammadex im Bereich der plasmatischen Gerinnungsfaktoren erscheinen aufgrund der beobachteten Effekte auf die aPTT und das INTEM<sup>®</sup>-Assay die Faktoren II, VIII, IX, X, XI und XII (Lippi, G. et al., 2008) wahrscheinlich. Darüber hinaus kommen aufgrund der beobachteten Effekte auf den Quick-Wert und das EXTEM<sup>®</sup>-Assay die Faktoren II, V, VII, X (Luxembourg, B. et al., 2008) in Betracht. Eine Überschneidung des intrinsischen und extrinsischen Aktivierungsweges lässt sich in der sogenannten gemeinsamen Endstrecke, d. h. bei den Faktoren X, V und II

finden. Darüber hinaus könnten auch die Komplexe der aktivierten Faktoren VIIIa und IXa (Tenase-Komplex) und der aktivierten Faktoren Xa und Va (Prothrombinase-Komplex) beeinflusst werden.

Bemerkenswerterweise wurden in den zur weitergehenden Untersuchung des Mechanismus durchgeführten Analysen der Aktivität der Einzelfaktoren jedoch lediglich geringe, wenngleich statistisch signifikante Aktivitätsabnahmen bei den Faktoren VIII, IX, XI und XII um 7%, 6,8%, 6,9% bzw. 4,3% gefunden. Diese relativ gering ausgeprägten Aktivitätsverminderungen erscheinen auf den ersten Blick nicht hinreichend, um die stärker ausgeprägten Effekte auf die Gerinnungszeiten zu erklären, zumal keiner der Faktoren in seiner Aktivität auf Werte unterhalb des Normalbereichs reduziert wurde (Favaloro, E. J. et al., 2005). Additive oder synergistische Effekte könnten jedoch möglicherweise eine ausreichende Erklärung für die beobachtete, wenngleich moderate Verlängerung der aPTT (13,1%) bieten. So konnten Burns et al. anhand von Mischungsversuchen mit Mangelplasmen zeigen, dass die Reduktion der Aktivität eines einzelnen Gerinnungsfaktors auf 50% nicht zu Verlängerungen der PT und der aPTT führt, solange die übrigen Gerinnungsfaktoren mit einer Aktivität von 100% vorliegen. Bei einem Mangel zweier Gerinnungsfaktoren mit einer Restaktivität von jeweils 75% zeigten sich jedoch deutliche Veränderungen in Quick-Wert und aPTT (Burns, E.R. et al., 1993). Insofern erscheint es durchaus plausibel, dass die beobachtete Reduktion der Aktivität von vier Faktoren des intrinsischen Aktivierungsweges (VIII, IX, XI, und XII) die beobachtete aPTT Verlängerung induzieren könnte. Während dies zwar eine mögliche Erklärung für die Verlängerungen der aPTT bzw. der CT im INTEM<sup>®</sup>-Assay darstellt, lassen sich die Veränderungen des Quick-Wertes und der

Gerinnungszeit im EXTEM<sup>®</sup>-Assay nicht anhand eines Mangels der betroffenen Faktoren erklären, da diese nicht in diesem extrinsisch aktivierten Assay bzw. der gemeinsamen Endstrecke repräsentiert werden. Mandal et al. konnten jedoch zeigen, dass eine durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MBCD) hervorgerufene Cholesteroldepletion humaner Fibroblasten zu einer verminderten Interaktion des Gewebefaktors (Tissue Factor, TF) mit Faktor VIIa an deren Oberfläche und in Folge dessen zu einer verminderten Aktivierung von Faktor X führt (Mandal, S. K. et al, 2005). Sollte das  $\gamma$ -Cyclodextrin Sugammadex also in ähnlicher Weise hemmende Effekte auf die Aktivität von Tissue Factor ausüben, würde dies die Verlängerung der Gerinnungszeiten extrinsischer, d. h. durch Thromboplastin (Tissue Factor und Phospholipide) aktivierter Assays erklären. Vergleichbare Untersuchungen unter Verwendung von  $\gamma$ -Cyclodextrinen liegen bislang nicht vor und auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind nicht geeignet, diese These zu prüfen.

Wie bereits erwähnt, waren die durch Sugammadex hervorgerufenen Effekte auf die Gerinnungszeiten der extrinsisch und intrinsisch aktivierten ROTEM<sup>®</sup>-Assays (EXTEM<sup>®</sup> und INTEM<sup>®</sup>) bemerkenswerterweise ausgeprägter, als in den plasmatischen Assays mit vergleichbaren Aktivierungswegen (Quick-Wert und aPTT). Dieses ist insbesondere für das EXTEM<sup>®</sup>-Assay überraschend, da dessen Werte einerseits eine relativ schlechte Korrelation mit dem Quick-Wert aufweisen (Rugeri, L. et al., 2007, Herbstreit, F. et al., 2010) und andererseits weniger sensitiv auf Veränderungen in den erfassten Gerinnungsfaktoren sind (Gudmundsdottir, B. R. et al., 2011). Ein wesentlicher Unterschied zwischen plasmatischen und Vollblut-Assays liegt im Vorhandensein von Thrombozyten im Vollblut. Die Annahme liegt daher nahe, dass eine Beeinflussung der

Thrombozytenfunktion durch Sugammadex für diesen Unterschied verantwortlich sein könnte. Da den Thrombozyten insbesondere in der Propagationsphase der Hämostase eine Schlüsselrolle bei der lokalisierten und suffizienten Thrombingenerierung zukommt (Hoffman, M. und Monroe, D. M., 2001), scheint die Annahme plausibel, dass eine Beeinflussung von deren Aktivierung und konsekutiv nachgeschalteter Prozesse zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit in Vollblut-Assays führen könnte.

Ein möglicher Angriffspunkt für Sugammadex sind die in der Membran der Thrombozyten lokalisierten Mikrodomänen, sogenannte „lipid rafts“. Hierbei handelt es sich um Untereinheiten der Zellmembranen, die wohl für die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation essentielle Organisationzentren sind (Simons, K. et al., 1997, van Lier, M. et al., 2005, Shrimpton, C. N. et al., 2002). Nach Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Lokalisierung der ansonsten frei flottierenden „lipid rafts“. Diese weisen einen funktionellen Zusammenhang insbesondere mit dem thrombozytären GP-Ib-IX-V-Komplex auf und werden daher als Schlüsselstelle für die vWF-assoziierten Prozesse der Thrombozytenaktivierung und die Lokalisation von Faktor IX und XI auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten betrachtet (Rawala-Sheikh, R. et al, 1990, Greengard, J. S. et al., 1986, Baglia, F. A., 2003, Baglia, F. A., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine MBGD-vermittelte Cholesteroldepletion der Thrombozytenmembran zu einer verminderten Thrombozytenaggregation nach Aktivierung mit von-Willebrand-Faktor/Ristocetin, Kollagen-, Adenosindisphosphat und Thrombin-Rezeptor-aktivierendem-Peptid führt (Grgurevich, S. et al., 2002, van Lier, M. et al., 2008, Shirashi, M. et al., 2010). In einer weiteren, noch unpublizierten Untersuchung

unserer Arbeitsgruppe konnten signifikante Effekte von Sugammadex auf die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaktivierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch  $\gamma$ -Cyclodextrine bzw. das modifizierte  $\gamma$ -Cyclodextrin Sugammadex die Thrombozytenaggregation beeinflussen. Zur Prüfung der These, dass dies zu einer verminderten Thrombingenerierung führen könnte, wären allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Einer weiteren Klärung bedarf auch die beobachtete signifikante Verkürzung der Clot Formation Time (CFT) um 16% im extrinsisch aktivierten Assay (EXTEM®). Die CFT korreliert im EXTEM® hoch-signifikant mit der Konzentration des Faktors VIII (Theusinger, O. M. et al., 2013), so dass eigentlich eine Verlängerung der CFT aufgrund der erniedrigten Faktor VIII Konzentration zu erwarten gewesen wäre. Ein möglicher Erklärungsansatz kann eine Interaktion des Sugammadex-Moleküls mit den durch Thrombin aktivierten Serinproteasen Protein C und Protein S oder ihren Rezeptoren sein, deren Funktion als Antikoagulanzen im Rahmen einer Gerinnungsaktivierung gestört werden könnte und eine Fibrinolyse somit gehemmt wird. Die Rezeptoren von Protein C wurden als Bestandteil der bereits erwähnten „lipid rafts“ auf den Membranen endothelialer Zellen nachgewiesen (Bae J. S. et al., 2007). Diese Hypothese ist jedoch spekulativ und kann mit den verwendeten Untersuchungsmethoden mechanistisch nicht geklärt werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie bezüglich der rotationsthromboelastometrisch gemessenen Gerinnselfestigkeit (MCF) müssen Limitationen der verwendeten Assays berücksichtigt werden. Die Kombination aus EXTEM®, INTEM®- und FIBTEM®-Assay ist zwar hervorragend dazu geeignet, eine Thrombozytopenie und auch schwere Thrombozytopathien

sowie eine Thrombozytenaggregationshemmung durch Glykoprotein-IIb-IIIa- (GpIIb-IIIa) Rezeptorantagonisten und auch einen Fibrinogenmangel bzw. Fibrinpolymerisationsstörungen zu detektieren und zu quantifizieren (Larsen, O.H. et al., 2011, Görlinger, K. et al., 2008, Herbstreit, F. et al., 2010). Die Effekte einiger potenter Thrombozytenaggregationshemmer, wie von Aspirin und P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten, können jedoch nicht mit den üblichen Assays detektiert werden (Harrison, P. et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit führte lediglich die kombinierte Applikation von Sugammadex und Rocuronium zu einer signifikanten Erniedrigung der MCF im FIBTEM<sup>®</sup>-Assay. Die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration nach Clauss war jedoch unbeeinflusst. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Rocuronium-Sugammadex-Komplex möglicherweise eine Fibrinpolymerisationsstörung hervorruft, wie sie auch unter übermäßiger Dilution mit kolloidalen Infusionslösungen auftritt (Fries et al., 2006). Eine Thrombopathie bzw. Thrombopenie bzw. eine Interaktion mit dem GPIIb-IIIa Rezeptor können jedoch aufgrund unserer Messergebnisse ausgeschlossen werden, da die Gerinnselfestigkeit (MCF) weder im EXTEM<sup>®</sup> noch im INTEM<sup>®</sup> signifikant vermindert ist.

Die Rotationsthemboelastometrie gilt als Gold-Standard zur bettseitigen Diagnostik einer Hyperfibrinolyse (Levrat, A. et al., 2008, Spiel, A.O., 2006). Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann eine Beeinflussung der endogenen Fibrinolyse durch die untersuchten Pharmaka ausgeschlossen werden. Es lässt sich jedoch annehmen, dass die entstehenden Gerinnsel aufgrund der verminderten Thrombingenerierung einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber fibrinolytischen Einflüssen unterliegen. Um diese These zu testen, wären



ROTEM®-Untersuchungen unter Zusatz eines Fibrinolytikums geeignet (Dirkmann, D. et al., 2012).

Für sich genommen ermöglichen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung allein keinen Aufschluss über den konkreten molekularen Mechanismus der nachgewiesenen antihämostatischen Effekte von Sugammadex. Anhand der vorliegenden Daten erscheinen jedoch sowohl Effekte auf die plasmatischen Gerinnungsfaktoren als auch durch Cholesteroldepletion hervorgerufene Effekte auf Ebene des Tissue Factor-VIIa-Komplexes und der Thrombozyten wahrscheinlich. Hier sind weitergehende Untersuchungen notwendig.

Ebenso ist die vorliegende Arbeit aufgrund ihres in vitro Charakters nicht geeignet, um eine etwaige Blutungsneigung von mit Sugammadex behandelten Patienten vorherzusagen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten gesunden Probanden wurde durch die in vitro Applikation von Sugammadex keine der erfassten Variablen allein in einen subnormalen Bereich verändert. Es ist jedoch anzunehmen, dass die beobachteten Effekte durch Sugammadex bei Vorliegen angeborener oder erworbener Gerinnungsstörungen akzentuiert werden könnten. Insbesondere vorbestehende Mangelzustände in den beeinflussten Faktoren, wie diese bei den Hämophilie-Formen A (Faktor VIII), B (Faktor IX) und C (Faktor XI) eintreten, oder erworbene Mangelzustände, wie etwa nach Hämodilution, lassen synergistische Effekte erwarten.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Studie ist, dass nur eine Dosierung von Sugammadex (finale Konzentration: 130 µg/ml, entsprechend einer klinischen Dosierung von 16 mg/kg Körpergewicht) untersucht wurde. Daher können derzeit keine Aussagen über mögliche Effekte niedrigerer oder höherer

Dosierungen von Sugammadex gemacht werden. Bei der untersuchten Dosierung handelt es sich jedoch um eine zur Notfallreversierung empfohlene und insofern klinisch relevante Dosis.

Zusammenfassend führt also Sugammadex in einer klinisch relevanten Konzentration in vitro zu einer moderaten, statistisch signifikanten Reduktion des Quick-Wertes und Verlängerung der aPTT sowie Verlängerungen der Gerinnungszeiten rotationsthromboelastometrischer Assays nach extrinsischer und intrinsischer Aktivierung. Die Effekte in den Vollblut Assays waren dabei ausgeprägter, als in den plasmatischen Gerinnungstests. Ein Teil dieser Effekte ist vermutlich durch eine durch Sugammadex hervorgerufene Verminderung der Aktivität der plasmatischen Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI und XII zu erklären. Eine mögliche Ursache für die stärkere Ausprägung der beobachteten Effekte in den durchgeführten Vollblut Assays ist eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion. Da weder die Applikation von Rocuronium allein noch die gemeinsame Applikation von Sugammadex und Rocuronium zu signifikanten Veränderungen führten, ist anzunehmen, dass die beschriebenen Effekte durch das Sugammadex-Molekül selbst hervorgerufen werden.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** Sugammadex ist ein Antagonist steroidaler Muskelrelaxanzien und gilt als hochselektiv für diese Substanzen. Im Rahmen der Zulassungsstudien wurden nach Applikation von Sugammadex jedoch Verlängerungen der Zeiten plasmatischer Gerinnungsassays beschrieben. Um einen möglichen Effekt von Sugammadex auf die Blutgerinnung zu testen, wurde dessen Einfluss auf Variablen plasmatischer und Vollblut-Gerinnungstests sowie die Aktivität einzelner plasmatischer Gerinnungsfaktoren in vitro untersucht.

**Methoden:** Effekte von Sugammadex, Rocuronium und des Rocuronium-Sugammadex-Komplexes wurden mittels plasmatischer Gerinnungstests (Thrombinzeit (TZ), Quick-Wert, aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Fibrinogenkonzentration) sowie extrinsisch und intrinsisch aktivierter thromboelastometrischer (ROTEM®) Vollblut-Assays untersucht. Des Weiteren wurde die Aktivität von Gerinnungsfaktoren (u. a. II, V, VII und VIII-XIII) analysiert.

**Ergebnisse:** Sugammadex führte zu einer mittleren Reduktion des Quick-Werts um 16,6% und zu einer Verlängerung der aPTT um 13,1%. Die Clotting Time im extrinsisch und intrinsisch aktivierten ROTEM®-Assay wurden im Mittel um 33,1% und 22,4% signifikant verlängert. Die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren VIII (-7%), IX (-7,8%), XI (-6,9%), XII (-4,3%) waren nach Zugabe von Sugammadex signifikant reduziert. Die übrigen bestimmten Variablen (TZ, Gerinnselfestigkeit und Fibrinolyse sowie die Aktivitäten der Faktoren II, V, VII, X und XIII) blieben unbeeinflusst. Weder Rocuronium noch der Rocuronium-Sugammadex-Komplex führten hingegen zu signifikanten Veränderungen in den durchgeführten Assays.

**Schlussfolgerung:** Sugammadex, nicht aber Rocuronium oder der Rocuronium-Sugammadex-Komplex, haben einen signifikanten antihämostatischen Einfluss auf plasmatische und im Vollblut bestimmte Gerinnungszeiten, der partiell durch die Interaktion mit den Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI und XIII erklärt werden könnte. Die beobachteten Effekte lassen darüber hinaus eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion annehmen. Ob diese Effekte eine klinisch apparente Blutungsneigung bedingen oder eine bereits bestehende aggravieren können, bleibt zu prüfen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) Abrishami, A., Ho, J., Wong, J., Yin, L., Chung, F. (2009): Sugammadex, a selective reversal medication for preventing postoperative residual neuromuscular blockade. The Cochrane database of systematic reviews
- 2) Bae, J. S., Yang, L., Rezaie, A. R. (2007): Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2867-2872
- 3) Baglia, F. A. (2003): The Glycoprotein Ib-IX-V Complex mediates localization of factor XI to lipid rafts on the platelet membrane. *Journal of Biological Chemistry* 278, 21744-21750
- 4) Baglia, F. A. (2004): Factor XI interacts with the leucine-rich repeats of glycoprotein Ib on the activated platelet. *Journal of Biological Chemistry* 279, 49323-49329
- 5) Bom, A., Bradley, M., Cameron, K., Clark, J. K., Van Egmond, J., Feilden, H., MacLean, E. J., Muir, A. W., Palin, R., Rees, D. C., Zhang, M. Q. (2002): A novel concept of reversing neuromuscular block: Chemical encapsulation of rocuronium bromide by a cyclodextrin-based synthetic host. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 266-270
- 6) Bowbrick, V.A., Mikhailidis, D. P., Stansby, G. (2000): The use of citrated whole blood in thromboelastography. *Anesth Analg* 90, 1086-1088
- 7) Burns, E. R., Goldberg, S. N., Wenz, B. (1993): Paradoxical effect of multiple mild coagulation factor deficiencies on the prothrombin time and activated partial thromboplastin time. *Am J Clin Pathol* 100, 94-98
- 8) Clauss, A. (1957): Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta haemat (Basel)*, 237-246
- 9) Davis, M. E., Brewster, M. E. (2004): Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 3, 1023-1035

- 10) DIN-Taschenbuch 261: Hämostaseologie, 3. Aufl. Berlin, Wien, Zürich: Beuth-Verl.; s. bes. S. 32-84
- 11) Dirkmann, D., Görlinger, K., Gisbertz, C., Dusse, F., Peters, J. (2012): Factor XIII and tranexamic acid but not recombinant factor VIIa attenuate tissue plasminogen activator-induced hyperfibrinolysis in human whole blood. *Anesth Analg* 114, 1182-1188
- 12) European Medicines Agency (2008): Produktinformation Bridion (27/07/2013 Bridion -EMA/H/C/000885 -IB/0016), Online-Publikation, zuletzt aktualisiert am 12.08.2013, Zugriff über <http://www.ema.europa.eu> am 28.08.2013
- 13) Favaloro, E. J., Soltani, S., McDonald, J., Grezchnik, E., Easton, L. (2005): Cross-laboratory audit of normal reference ranges and assessment of ABO blood group, gender and age on detected levels of plasma coagulation factors. *Blood Coagul Fibrinolysis* 16, 597-605
- 14) Fickenscher, K., Aab, A., Stüber, W. (1991): A photometric assay of prekallikrein in human plasma: Comparison of amidolytic, esterolytic, coagulation and immunochemical assays. *Blood* 59, 963-970
- 15) Fries, D., Innerhofer, P., Reif, C., Streif, W., Klingler, A., Schobersberger, W., Velik-Salchner, C., Friesenecker, B. (2006): The effect of fibrinogen substitution on reversal of dilutional coagulopathy: An in vitro model. *Anesth Analg* 102, 347-351
- 16) Gijzenbergh, F., Ramael, S., Houwing, N., van Iersel, T. (2005): First human exposure of Org 25969, a novel agent to reverse the action of rocuronium bromide. *Anesthesiology* 103, 695-703
- 17) Görlinger, K., Jambor, C., Dirkmann, D., Dusse, F., Hanke, A., Adamzik, M. et al. (2008): Messung der Thrombozytenfunktion mit Point-of-Care-Methoden. *Herz* 33, 297-305

- 18) Greengard, J. S., Heeb, M. J., Ersdal, E., Walsh, P. N., Griffin, J. H. (1986): Binding of coagulation factor XI to washed human platelets. *Biochemistry* 25, 3884-3890
- 19) Grgurevich, S., Krishnan, R., White, M. M., Jennings, L. K. (2003): Role of in vitro cholesterol depletion in mediating human platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 1, 576-586
- 20) Gudmundsdottir, B. R., Francis, C. W., Bjornsdottir, A. M., Nellbring, M., Onundarson, P.T. (2012): Critical role of factors II and X during coumarin anticoagulation and their combined measurement with a new Fiix-prothrombin time. *Thrombosis Research* 130, 674-681
- 21) Harrison, P., Frelinger, A. L., Furman, M. I., Michelson, A. D. (2007): Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thrombosis Research* 120, 323-336
- 22) Hartert, H. (1948): Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Woch* 26, 577-583
- 23) Herbstreit, F., Winter, E. M., Peters, J., Hartmann, M. (2010): Monitoring of haemostasis in liver transplantation: Comparison of laboratory based and point of care tests. *Anaesthesia* 65, 44-49
- 24) Hoffman, M., Monroe, D. M. 3rd (2001): A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85, 958-965
- 25) Karimi, M., Bereczky, Z., Cohan, N., Muszbek, L. (2009): Factor XIII deficiency, *Semin Thromb Hemost* 35, 426-438
- 26) Kim, K. S., Lew, S. H., Cho, H. Y., Cheong, M. A. (2002): Residual paralysis induced by either vecuronium or rocuronium after reversal with pyridostigmine. *Anesth Analg* 95, 1656-1660
- 27) Lang, T., Depka, M. von (2006): Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. *Hämostaseologie* 23 Suppl 1, 20-29

- 28) Larsen, O. H., Fenger-Eriksen, C., Christiansen, K., Ingerslev, J., Sørensen, B. (2011): Diagnostic performance and therapeutic consequence of thromboelastometry activated by kaolin versus a panel of specific reagents. *Anesthesiology* 115, 294-302
- 29) Ledowski, T., Hillyard, S., O'Dea, B., Archer, R., Vilas-Boas, F., Kyle, B. (2013): Introduction of sugammadex as standard reversal agent: Impact on the incidence of residual neuromuscular blockade and postoperative patient outcome. *Indian J Anaesth* 57, 46-51
- 30) Levrat, A., Gros, A., Rugeri, L., Inaba, K., Floccard, B., Negrier, C., David, J.S. (2008): Evaluation of rotation thrombelastography for the diagnosis of hyperfibrinolysis in trauma patients. *Br J Anaesth* 100, 792-797
- 31) Lippi, G., Favaloro, E. J. (2008): Activated partial thromboplastin time: New tricks for an old dogma. *Semin Thromb Hemost* 34, 604-611
- 32) Lusher, J. M., Hillman-Wiseman, C., Simpson, P. (1996): Plasma FVIII levels measured after infusion of recombinant FVIII (RFVIII) vary significantly with different assay methods. *Blood* 86 Suppl I, Abstract 755
- 33) Luxembourg, B., Krause, M., Lindhoff-Last, E. (2008): Basiswissen Gerinnungslabor. *Dtsch Arztebl* 104, A 1489-1498
- 34) Mandal, S. K., Iakhiaev, A., Pendurthi, U. R., Rao, L. V. (2005): Acute cholesterol depletion impairs functional expression of tissue factor in fibroblasts: Modulation of tissue factor activity by membrane cholesterol. *Blood* 105, 153-160
- 35) McDonnell, N., Pavy, T., Green, L., Platt, P. (2011): Sugammadex in the management of rocuronium-induced anaphylaxis. *Br J Anaesth* 106, 199-201
- 36) Mirakhur, R. K. (2009): Sugammadex in clinical practice. *Anaesthesia* 64 Suppl 1, 45-54

- 37) Mittermayr, M., Velik-Salchner, C., Stalzer, B., Margreiter, J., Klingler, A., Streif, W., Fries, D., Innerhofer, P. (2009): Detection of protamine and heparin after termination of cardiopulmonary bypass by thrombelastometry (ROTEM): Results of a pilot study. *Anesth Analg* 108, 743-750
- 38) Naguib, M. (2007): Sugammadex: Another milestone in clinical neuromuscular pharmacology. *Anesth Analg* 104, 575-581
- 39) Naguib, M., Brull, S. J. (2009): Update on neuromuscular pharmacology. *Curr Opin Anaesthesiol* 22, 483-490
- 40) Pentapharm GmbH (2009): ROTEM® delta, Vollblut-Gerinnungsanalyse basierend auf der Thromboelastometrie, Bedienerhandbuch. Version 1.6.0.01.DE 2009 München; s. bes. S. 4-1 - 4-12
- 41) Rawala-Sheikh, R., Ahmad, S. S., Monroe, D. M., Roberts, H. R., Walsh, P. N. (1990): Structural requirements for factor IXa binding to platelets. *FASEB J* 4, A2276
- 42) Rugeri, L., Levrat, A., David, J. S., Delecroix, E., Floccard, B., Gros, A., Allaouchiche, B., Negrier, C. (2007): Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography. *J Thromb Haemost* 5, 289-295
- 43) Shields, M., Giovannelli, M., Mirakhur, R. K., Moppett, I., Adams, J., Hermens, Y. (2006): Org 25969 (sugammadex), a selective relaxant binding agent for antagonism of prolonged rocuronium-induced neuromuscular block. *Br J Anaesth* 96, 36-43
- 44) Sorgenfrei, I. F., Norrild, K., Larsen, P. B., Stensballe, J., Ostergaard, D., Prins, M. E., Viby-Mogensen, J. (2006): Reversal of rocuronium-induced neuromuscular block by the selective relaxant binding agent sugammadex: A dose-finding and safety study. *Anesthesiology* 104, 667-674



- 45) Sparr, H. J., Vermeyen, K. M., Beaufort, A. M., Rietbergen, H., Proost, J. H., Saldien, V., Velik-Salchner, C., Wierda, J. M. (2007): Early reversal of profound rocuronium-induced neuromuscular blockade by sugammadex in a randomized multicenter study. *Anesthesiology* 106, 935-943
- 46) Spiel, A. O., Mayr, F. B., Firbas, C., Quehenberger, P., Jilma, B. (2006): Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans. *J Thromb Haemost* 4, 411-416
- 47) Szejtli, J. (2004): Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem* 76, 1825-1845
- 48) Theusinger, O. M., Wanner, G. A., Emmert, M.Y., Billeter, A., Eismon, J., Seifert, B., Simmen, H. P., Spahn, D. R., Baulig, W. (2011): Hyperfibrinolysis diagnosed by rotational thromboelastometry (ROTEM) is associated with higher mortality in patients with severe trauma. *Anesth Analg* 113, 1003-1012
- 49) Theusinger, O. M., Schröder, C. M., Eismon, J., Emmert, M. Y., Seifert, B., Spahn, D. R., Baulig, W. (2013): The influence of laboratory coagulation tests and clotting factor levels on rotation thromboelastometry (ROTEM(R)) during major surgery with hemorrhage. *Anesth Analg* 117, 314-321
- 50) van Lier, M., Verhoef, S., Cauwenberghs, S., Heemskerk, J. W., Akkerman, J. W., Heijnen, H. F. (2008): Role of membrane cholesterol in platelet calcium signalling in response to VWF and collagen under stasis and flow. *Thromb Haemost* 99, 1068-1078

## 7. Abkürzungen

©	Copyright, Kennzeichnung eines bestehenden Schutzes
®	registrierter Markenname
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
bzw.	beziehungsweise
CD	Cyclodextrin
CFT	Clot Formation Time
CLI	Clot Lyse Index
CT	Clotting Time
d. h.	das heisst
DIN	Deutsche Industrienorm
EMA	European Medicine Agency
EPAR	European Public Assessment Report
FVIIa	aktivierter Faktor VII
g	Erdbeschleunigung
GpIIb-IIIa	Glykoprotein-IIb-IIIa
kg	Kilogramm

MBCD	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
MCF	Maximum Clot Firmness
mg	Milligramm
ml	Milliliter
ML	Maximale Lyse
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
nm	Nanometer
PT	Prothrombinzeit
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force)
ROTEM	Rotationsthromboelastometrie
s. bes. S.	siehe besonders Seite
Tab.	Tabelle
TEG	Thrombelastographie
TF	Tissue Factor (dt. Gewebefaktor)
TPZ	Thromboplastinzeit
TRAP	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid
TZ	Thrombinzeit
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

## **8. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. Peters für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie zahlreiche Vorschläge und Korrekturen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Drs. med. Görlinger und Dirkmann für die hervorragende Anleitung bei der Planung und Durchführung, die Unterstützung bei der Beantwortung zahlreicher Fragen, die freundliche Mithilfe bei der statistischen Analyse sowie die Möglichkeit, bei Fragen und Problemen stets konstruktive Unterstützung und Ratschläge zu erhalten.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Frau Ursula Brecklinghaus und Frau Bärbel Hermann, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, für die freundliche und vielfältige Unterstützung bedanken sowie auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrallabors für die geleistete Arbeit und die Durchführung der aufwändigen Faktorenanalysen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Frau, welche mich während des Studiums und auch jetzt im Berufsleben unterstützen. Sie geben mir Kraft, Rückhalt und viel Verständnis. Ihnen ist diese Arbeit von ganzem Herzen gewidmet.

## **9. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.